

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ CH 692 839 A5

⑮ Int. Cl. 7: B 01 D 011/02  
C 07 H 017/08  
C 07 K 007/64  
C 07 D 267/22

⑫ PATENTSCHRIFT A5



⑯ Gesuchsnummer:	02085/97
⑰ Anmeldungsdatum:	05.09.1997
⑲ Priorität:	11.09.1996 GB 9618952.7
⑳ Patent erteilt:	29.11.2002
㉑ Patentschrift veröffentlicht:	29.11.2002

⑳ Inhaber:  
Novartis AG, Schwarzwaldallee 215,  
4058 Basel (CH)

㉒ Erfinder:  
Dr. Peter Fünfschilling, Ochsengasse 62,  
4123 Allschwil (CH)  
Dr. Berthold Schenkel, Florastrasse 39,  
4057 Basel (CH)

㉔ Verfahren zum Reinigen eines Produktes von Verunreinigungen, die relativ nahe Verteilungskoeffizienten aufweisen.

㉕ Die Erfindung schafft ein Verfahren zur Reinigung eines Cyclosporins, zum Beispiel Cyclosporin A, oder eines Macrolids zu einem hohen Reinigungsgrad in grossem Massstab. In einem anderen Aspekt schafft die Erfindung eine Menge Cyclosporin A mit einem Verunreinigungsniveau von weniger als etwa 0,7%, zum Beispiel etwa 0,5%, und Zusammensetzungen davon.

BEST AVAILABLE COPY.



CH 692 839 A5

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Reinigungsverfahren und insbesondere ein Verfahren zum Reinigen eines Produkts von Verunreinigungen, die relativ nahe Verteilungskoeffizienten miteinander aufweisen.

Extraktionsverfahren sind zum Trennen von Kohlenwasserstoffen in der petrochemischen Industrie gut bekannt. Es ist bekannt, dass Verteilungskoeffizienten von Kohlenwasserstoffen zwischen gegebenen Phasensystemen in solchen Anwendungen sich eine von der anderen wesentlich unterscheidet.

Überblicke über Extraktionsverfahren sind zum Beispiel veröffentlicht in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4. Ausgabe, Band 10, Seiten 125-180, veröffentlicht bei John Wiley & Sons 1993, und in The Handbook of Solvent Extraction, Herausgeber Lo, Baird & Hanson, veröffentlicht bei Krieger 1991. Der Inhalt dieser Publikationen wird hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Gegenwärtig wird die Reinigung von Produkten von biotechnologischen Verfahren in grossem Massstab im Allgemeinen durch Extraktions- oder Absorptionschromatografie durchgeführt. Solche Produkte umfassen Peptide, Makrolide und Proteine, die im Allgemeinen als Gemische von Produkten mit nah verwandten strukturellen und/oder physikalischen Eigenschaften hergestellt werden. Fraktionierende Extraktionsverfahren, die in der petrochemischen Industrie bekannt sind, wurden bisher nicht in der biotechnologischen Industrie in grossem Massstab zum Reinigen von aktiven Mitteln, zum Beispiel Peptiden, die miteinander nah verwandte physikalische Eigenschaften aufweisen, angewendet. Die vorliegenden Erfinder betrachten es als ein Hauptproblem, dass die entsprechenden Verteilungskoeffizienten von biotechnologischen Produkten und Verunreinigungen zwischen gegebenen Phasen nahe beieinander liegen. Demgemäß stellt die Erfindung in einem Aspekt ein Verfahren zum Reinigen eines Produkts von einem Einsatzmaterial bereit, das eine oder mehrere Verunreinigungen enthält, das nah verwandte physikalische Eigenschaften mit dem Produkt aufweist, wobei das Verfahren umfasst:

Zuführen des Einsatzmaterials in eine Extraktionsäule unter Bedingungen, die zum Trennen von mehr oder weniger polaren Verunreinigungen von dem Einsatzmaterial angepasst sind, wobei eine leichtere Phase gegen eine schwerere Phase fliesst, wodurch eine Ausbringung in einer Phase gebildet wird, die weniger mehr oder weniger polare Verunreinigungen enthaltendes Produkt aufweist, sodass die Ausbringung das Produkt in einer im Wesentlichen gereinigten Form enthält.

Das Einsatzmaterial für das vorstehende Verfahren kann durch das Ausbringen aus einer chromatografischen Reinigung oder anderen Vorreinigungsschritten, zum Beispiel Dekantation, bereitgestellt werden. Dieses Verfahren kann so durchgeführt werden, dass die Ausbringung als Einbringung für eine nachfolgende chromatografische Reinigung, zum Beispiel in einer seriellen Anordnung, dient.

In einem anderen Aspekt schafft die Erfindung

ein Verfahren zum Reinigen eines Produkts von einem Einsatzmaterial, das eine oder mehrere Verunreinigungen enthält, die nah verwandte physikalische Eigenschaften mit dem Produkt aufweisen, wobei das Verfahren umfasst:

- 5 a) Zuführen des Einsatzmaterials in eine erste Extraktionsäule unter Bedingungen, die zum Trennen von mehr oder weniger polaren Verunreinigungen von dem Einsatzmaterial angepasst sind, wobei eine leichtere Phase gegen eine schwerere Phase fliesst, wodurch eine erste Ausbringung in einer Phase gebildet wird, die das Produkt aufweist, das weniger mehr oder weniger polare Verunreinigungen enthält, und
- 10 b) Zuführen der ersten Ausbringung in eine zweite Extraktionsäule unter Bedingungen, die für das Trennen von weniger bzw. mehr polaren Verunreinigungen von der ersten Ausbringung angepasst sind, wobei die leichtere Phase gegen die schwere Phase fliesst, wodurch in einer Phase eine zweite Ausbringung gebildet wird, sodass die zweite Ausbringung das Produkt in einer im Wesentlichen gereinigten Form enthält.

Das Einsatzmaterial kann durch bekannte Verfahren, zum Beispiel durch Fermentation, hergestellt werden. Wenn das Produkt in einer Fermentationsbrühe hergestellt wird, dann kann die Brühe filtriert und mit einem Lösungsmittel gemischt werden, durch das das Produkt in einem unreinen Zustand präzipitiert werden kann. Typischerweise kann die Fermentationsbrühe mehreren Reinigungs- und Aufarbeitungsschritten unterzogen werden, bevor sie als Einsatzmaterial in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet wird. Anfängliche Filtration(en) und Präzipitation(en) dienen dazu, um zum Beispiel natürliche Farbstoffe und leicht brennbare Verunreinigungen von dem Produkt zu entfernen, und kann zur Erhöhung der Phasentrennung in den Extraktionsschritten dienen.

Der Ausdruck «Phase», wie er hier verwendet wird, wird dahingehend verstanden, ein System mit mindestens einer Komponente zu bedeuten. Die Phase kann ein einzelnes Lösungsmittel oder ein Gemisch von zum Beispiel zwei, drei oder mehr Lösungsmitteln umfassen.

Der Ausdruck «nah verwandte physikalische Eigenschaften», wie er hier verwendet wird, wird dahingehend verstanden, dass das Produkt schwierig von der anderen oder den anderen Verunreinigungen getrennt werden kann. Die nah verwandten physikalischen Eigenschaften können zum Beispiel umfassen die entsprechenden Verteilungskoeffizienten des Produkts und eine oder mehrere Verunreinigungen zwischen zwei Phasen. Für ein Cyclopeptid, zum Beispiel ein Cyclosporin, und insbesondere Cyclosporin A, kann das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten, d.h. der Verteilungskoeffizient von Cyclosporin A/Verteilungskoeffizient der Verunreinigung, zwischen etwa 3 und etwa 0,4 betragen, zum Beispiel zwischen 1,5 und etwa 0,8. Diese Verhältnisse sind als Selektivitäten bekannt.

Der hier verwendete Ausdruck «in grossem Massstab», wie er für Reinigungsanlagen verwendet wird, wird dahingehend verstanden, eine Anlage mit einer Ausbringung von etwa einer oder mehreren

ren Tonnen gereinigten Materials pro Jahr, zum Beispiel 10 Tonnen pro Jahr, oder mehr, zum Beispiel etwa 20 bis etwa 40 Tonnen, zu bedeuten.

Der Ausdruck «Verunreinigung» wie er hier verwendet wird, wird dahingehend verstanden, eine unerwünschte Komponente zu bedeuten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann für eine grosse Vielzahl von Produkten, zum Beispiel Peptiden, wie Cyclosporine, zum Beispiel Cyclosporin A und Derivate davon, Cyclosporin D und Derivate davon oder Cyclosporin G und Derivate davon angewendet werden. Ein Beispiel eines Cyclosporin-D-Derivats ist zum Beispiel ( $[3'$ -Desoxy- $3'$ -oxo-MeBmt]-[Val] $^2$ -Cyclosporin), wie es in der EP 296 122 offenbart ist; oder Makrolide, zum Beispiel Rapamycine und Derivate davon und Ascomycine und Derivate davon, die zum Beispiel durch Fermentation hergestellt werden. Beispiele von Makroliden, die unter Verwendung des erfindungsgemässen Verfahrens gereinigt werden können, umfassen Rapamycin; 40-O(2-Hydroxy)ethyl-Rapamycin, wie es in der PCT/EP93/02604 beschrieben ist; Ascomycin; 33-Epichlor-33-desoxyascomycin, wie es in der EP 427 680 in Beispiel 66a beschrieben ist; 5,6-Dehydro-ascomycin, wie es in der EP 626 385 offenbart ist; oder ein Ascomycinderivat, das als FK506 bekannt ist.

Ein Verfahren zum Herstellen von Cyclosporin A ist zum Beispiel in Beispiel 1 der britischen Patentbeschreibung 1 491 509 beschrieben. Verfahren zum Herstellen von FK506 sind in EP 184 162 beschrieben.

Eine Vielzahl von Säulen sind bekannt und kommerziell erhältlich. In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine einzelne Säule verwendet, die eine Gegenstromsäule ist, die zum mechanischen Schütteln und/oder Röhren des Einsatzmaterials/Phasensystems angepasst ist. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden zwei oder mehr Säulen verwendet, wobei mindestens eine davon eine Gegenstromsäule ist, die zum mechanischen Schütteln und/oder Röhren des Einsatzmaterials/Phasensystems angepasst ist.

Vorzugsweise umfasst die Säule(en) mechanisches Schütteln, zum Beispiel Rotationsschütteln oder eine Kolonne mit schwingenden Böden. Eine für das mechanische Schütteln angepasste Extraktionssäule ist kommerziell von Kuehni Company, Schweiz, erhältlich.

In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung eine gegenströmige flüssig-flüssig Extraktionssäule bereit, die zum Rotationsschütteln angepasst ist, und die eine ausreichende Anzahl von Böden oder Kompartimenten aufweist, um bei der Verwendung die Trennung eines Pharmazeutikums von Verunreinigungen zu bewirken.

In einem weiteren Aspekt schafft die Erfindung eine gegenströmige flüssig-flüssig Extraktionssäule, die zum Rotationsschütteln zum Trennen eines Pharmazeutikums von Verunreinigungen angepasst ist.

Die Säule(en) können für die Temperatureinstellung der Phasen angepasst sein. Eine Ummantelung kann bereitgestellt werden, um zum Beispiel eine erwünschte Temperatur in der Säule aufrecht-

zuerhalten. Wenn zum Beispiel ein Cyclosporin gereinigt wird, kann die Temperatur in der Säule bei zwischen etwa 0 und etwa 100°C, vorzugsweise zwischen etwa 20 und etwa 80°C und bevorzugter zwischen etwa 30 und etwa 60°C, aufrechterhalten werden.

Die Phasen, die für die Extraktionsschritte des Verfahrens gewählt werden, können vom Verteilungskoeffizienten zwischen den Phasen und der Löslichkeit des Produkts in jeder betrachteten Phase abhängen. Schnelle und effiziente Trennung der Phasen ist wünschenswert, und die Trennung kann im Wesentlichen vollständig sein, z.B. innerhalb etwa einer Minute, vorzugsweise 30 Sekunden und bevorzugter innerhalb etwa 20 Sekunden.

Ein Zweiphasensystem wird im erfindungsgemässen Verfahren angewendet, wobei die Phasen miteinander nicht mischbar oder im Wesentlichen nicht mischbar sind. Mindestens eine Phase kann eine wässrige Phase sein. Das Zweiphasensystem trennt sich, um eine leichtere, zum Beispiel nicht wässrige, organische Phase, die mindestens eine Lösungsmittelkomponente aufweist, und eine schwerere, zum Beispiel wässrige Phase, die mindestens eine Lösungsmittelkomponente und Wasser aufweist, zu bilden. Das zu reinigende Produkt kann leichter in einer Phasenkomponente löslich sein, die daher als Extraktionskomponente dient.

Vorzugsweise ist eine Phase eine wässrige Phase und eine Phase eine nicht wässrige Phase. Die wässrige Phase kann mindestens etwa 20 Prozent, zum Beispiel mehr als etwa 40 Gew.-% Wasser, enthalten, und kann bis zu 100 Gew.-% Wasser aufweisen. Die wässrige Phase kann die schwerere Phase sein. Das im erfindungsgemässen Verfahren verwendete Phasensystem kann als organische Phase mindestens einen Kohlenwasserstoff aufweisen, zum Beispiel ein C<sub>5</sub>- bis C<sub>12</sub>-Alkan, zum Beispiel n-Heptan, Cyclohexan oder Methylcyclohexan. Als wässrige Phase fassen die Anmelder zusätzlich zu Wasser, Ketone, zum Beispiel Aceton, Ester, zum Beispiel Amylacetat, n-Butylacetat oder Isopropylacetat oder Alkohole, zum Beispiel Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol, n-Butanol, s-Butanol, t-Butanol oder ein Pentanol ins Auge. Aceton ist das bevorzugte Extraktionslösungsmittel für Cyclosporin A.

Es wird erkannt werden, dass mindestens eine Komponente bei den Phasen gemeinsam ist. Die gemeinsame Komponente kann jedes der vorstehend erwähnten Lösungsmittel, zum Beispiel Wasser, Kohlenwasserstoffe, Alkohole, Ketone oder Ester umfassen.

Die vorliegenden Anmelder haben gefunden, dass ein n-Heptan/Aceton/Wassersystem wirksam für die Reinigung von Acomycin und Derivaten davon, Rapamycin und Derivaten davon und Cyclosporin A ist. In einer Ausführungsform wird das folgende Phasensystem zum Reinigen von Cyclosporin A verwendet: die leichtere Phase umfasst ein Gemisch in Gewichtsprozent von etwa 75% n-Heptan und etwa 25% Aceton; die schwerere Phase umfasst ein Gemisch von etwa 50% Aceton und etwa 50% Wasser. Der Wassergehalt der leichteren, im Wesentlichen nicht wässrigen Phase, ist ty-

pischerweise weniger als 10 Gew.-%, vorzugsweise weniger als etwa 2 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der wässrigen Phase.

In einer anderen Ausführungsform wird das folgende Phasensystem verwendet, um 40-O-(2-Hydroxy)ethyl-Rapamycin zu reinigen: die leichtere Phase kann ein Gemisch in Gewichtsprozent von etwa 75%, zum Beispiel 74%, n-Heptan, etwa 25%, zum Beispiel 25,5%, Aceton und eine kleine Menge Wasser, zum Beispiel 0,5% Wasser, umfassen. Die schwerere Phase kann ein Gemisch von kleinen Mengen, zum Beispiel 0,4% n-Heptan und etwa 50%, zum Beispiel 52,8%, Aceton, und etwa 50%, zum Beispiel 46,8%, Wasser aufweisen.

Die vorliegenden Anmelder haben gefunden, dass ein n-Heptan/Isopropanol/Wassersystem zum Reinigen von 33-Epi-chlor-33-desoxyascomycin wirksam ist. In einer Ausführungsform wird das folgende Phasensystem verwendet, um 33-Epi-chlor-33-desoxyascomycin zu reinigen: die leichtere Phase umfasst ein Gemisch in Gewichtsprozent von etwa 90% n-Heptan, zum Beispiel 89%, und etwa 10% Isopropanol, zum Beispiel 11%, die schwerere Phase umfasst ein Gemisch von etwa 32% Isopropanol, zum Beispiel 31%, und etwa 68% Wasser, zum Beispiel 69%.

Der Verteilungskoeffizient wird hier als das Verhältnis der Konzentration (in g/Volumeneinheit) des Produkts in der leichteren Phase zur Konzentration (in g/Volumeneinheit) des Produkts in der schweren wässrigen Phase bei 40°C definiert. Die folgenden Verteilungskoeffizienten werden für Cyclosporine zwischen 75% n-Heptan/25% Aceton als leichtere organische Phase und 50% Aceton/ 50% Wasser als schwerere wässrige Phase erhalten:

Cyclosporin	Verteilungskoeffizient (auf eine Dezimalstelle)
A	0,8
B	0,4
C	0,3
D	1,7
Dihydro-A	1,0
G	1,3
L	0,5
U	0,6

Vom Vorstehenden wird deutlich werden, dass die jeweiligen Verteilungskoeffizienten für Cyclosporine relativ nahe beieinander liegen. Wenn zum Beispiel Cyclosporin A gereinigt wird, dann umfassen die von Cyclosporin A zu trennenden Verunreinigungen typischerweise andere Cyclosporine.

Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass Cyclosporin A hergestellt werden kann, das im Wesentlichen frei von anderen Verunreinigungen, wie andere Cyclosporine, zum Beispiel Cyclosporin B, Cyclosporin C oder Dihydro-Cyclosporin A ist. Somit sind die jeweiligen Mengen von Verunreinigungen an Cyclosporinderivat, zum Beispiel Cyclosporin B,

Cyclosporin C und Cyclosporin G, in Cyclosporin A, das unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt wird, typischerweise unterhalb durch Verwendung von HPLC analytisch nachweisbarer Grenzen. Somit wurde gefunden, dass die Verunreinigungen in Cyclosporin A weniger als etwa 0,7 Flächen-%, zum Beispiel etwa 0,5% oder weniger, zum Beispiel etwa 0,3%, betragen, wobei HPLC verwendet wurde.

5 In einem anderen Aspekt stellt daher die Erfindung eine Menge, zum Beispiel 1 kg oder mehr, zum Beispiel 10 kg oder mehr, zum Beispiel 20, 30, 40, 50 kg oder mehr Cyclosporin A mit einem Verunreinigungsniveau von etwa 0,7 Flächen-%, zum Beispiel 0,5% oder weniger, bereit, wobei HPLC verwendet wurde. Die Erfindung stellt weiterhin eine Menge an Cyclosporin A bereit, das einen Reinheitsgrad von 99,5% oder grösser, zum Beispiel 99,7% oder grösser, aufweist. Die Verunreinigungen, die in gereinigtem Cyclosporin A der Erfindung gefunden wurden, bestehen aus andren Cyclosporinen.

10 In einem anderen Aspekt der Erfindung wird eine Zusammensetzung bereitgestellt, die Cyclosporin A als aktives Mittel in einer Menge in gereinigter Form aufweist, wobei die Menge an vorliegenden Verunreinigungen unter 0,7 Flächen-%, zum Beispiel 0,5 Flächen-%, liegt, wobei HPLC verwendet wurde.

15 Die Verteilungskoeffizienten von 40-O-(2-Hydroxy)ethyl-Rapamycin wurden gefunden zwischen 0,7 und 1,4 zu betragen, wenn n-Heptan/Aceton/Wasserphasen verwendet wurden. Die Verhältnisse von Verteilungskoeffizienten, zum Beispiel Selektivitäten, für Rapamycin zu 40-O-(2-Hydroxy)ethyl-Rapamycin liegt im Bereich von etwa 1,4 bis etwa 2,3, zum Beispiel etwa 1,5.

20 Der Verteilungskoeffizient für 33-Epi-chlor-33-desoxyascomycin wurde gefunden, etwa 7,6 zu betragen, wobei das vorstehende n-Heptan/Isopropanol/Wasser-Phasensystem verwendet wurde. Die Selektivität von Ascomycinderivat-Nebenprodukten zu 33-Epi-chlor-33-desoxyascomycin wurde gefunden, etwa 1,44 zu sein.

25 Der pH der wässrigen Phase, wenn sie vorliegt, beträgt typischerweise zwischen etwa 2 und etwa 9, zum Beispiel pH 7.

30 Die Bedingungen des Extraktionsverfahrens, einschliesslich der Anzahl der theoretischen Stufen, kann unter Verwendung von Routineexperimenten und, zum Beispiel, Computersimulationen ausgewählt werden. Ein für einen solchen Zweck geeignetes Programm ist kommerziell unter der Marke ASPEN PLUS erhältlich.

35 Die genauen Bedingungen für das Funktionieren der Erfindung hängen typischerweise von einer Anzahl von Faktoren, einschliesslich der Dimensionen der Säule(en), Flüssigkeitsdynamiken, Geschwindigkeit des Rührers, Effizienz und Anzahl der Böden oder Kompartimente ab.

40 Kompartimente, die eine Effizienz von etwa 10 bis 30%, zum Beispiel 12 bis 25%, aufweisen, können für die Säule(en) der Erfindung geeignet sein. Die Säuleneffizienz, wie sie hier verwendet wird, wird verstanden, die Anzahl der aktuellen Stufen dividiert durch die Anzahl der theoretischen Stufen zu bedeuten.

Es wird durch den Fachmann auf diesem Gebiet erkannt, dass eine Extraktionssäule im Betrieb einen Flutpunkt aufweist. Die jeweiligen Flutpunkte der Phasen können daher ausgewählt werden, um das System in der oder jeder Säule unter dem Flutpunkt, zum Beispiel etwa 10 oder 20% unter dem Flutpunkt, aufrechtzuerhalten. Auf diese Weise kann eine hohe Turbulenz und schneller Massentransfer zwischen den Phasen erhalten werden.

Die vorliegenden Anmelder haben gefunden, dass für eine gegebene Säule der Flutpunkt erreicht werden kann, wenn eine bestimmte Rührergeschwindigkeit erreicht und/oder überschritten wird, was im Nachfolgenden als die kritische Geschwindigkeit bezeichnet wird. Rührergeschwindigkeiten, die in einer Säule im erfindungsgemässen Verfahren angewendet werden, können zwischen etwa 15 und etwa 20 rpm betragen. Typischerweise können die Rührergeschwindigkeiten im grossen Massstab zwischen etwa 5 und etwa 60 rpm betragen. Die Anmelder haben gute Ergebnisse unter Verwendung einer Rührergeschwindigkeit von etwa 10 bis 20% unter der kritischen Geschwindigkeit erhalten.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann das gleiche Lösungsmittelsystem(e) in jeder Säule verwendet werden, und die jeweiligen Fließgeschwindigkeiten können variiert werden, sodass das gewünschte Produkt in beide Phasen extrahiert werden kann. Die jeweiligen Fließgeschwindigkeiten können unter Verwendung von Routineexperimenten und Computersimulationen unter Verwendung von beispielsweise vorstehendem Computerprogramm bestimmt werden.

Das erfindungsgemäss Verfahren kann ein hochreines Produkt ergeben, insbesondere wenn es zum Beispiel mit Destillations-Präzipitations- und/oder Kristallisationsschritten verbunden wird. Nach einem Kristallisationsschritt kann das Lösungsmittel oder die Lösungsmittel abdestilliert, gesammelt und rückgeführt werden. Das Produkt kann in bekannter fester Form erhalten werden.

Das erfindungsgemäss Verfahren kann zur Reinigung von zum Beispiel Cyclosporinen eingesetzt werden, um einen Reinheitsgrad von grösser als 98,5 Flächen-%, z.B. 99,3% oder grösser, unter Verwendung von HPLC und verbesserte Gesamtausbeuten, verglichen mit der chromatografischen Reinigung, erzielt werden.

Die Reihenfolge der Extraktion, die in dem Zweistufenprozess der vorliegenden Erfindung verwendet wird, kann umgedreht werden: die weniger polaren Verunreinigungen können von dem unreinen Produkt in der ersten Säule entfernt werden, und die polareren Verunreinigungen können in der zweiten Säule entfernt werden. Wenn das zu reinigende Produkt von einer einzelnen Verunreinigung oder nur von weniger polaren Komponenten oder nur von polareren getrennt werden soll, kann das Verfahren so angepasst werden, dass es einen einzelnen Extraktionsschritt, zum Beispiel nur vorstehenden Schritt a) oder nur Schritt b), umfasst.

Das Folgende ist nur eine exemplarische Beschreibung des erfindungsgemässen Reinigungsprozesses, die durch die begleitenden Zeichnungen illustriert wird, wobei das Verfahren in einer Pilotan-

lage mit einer Ausbringkapazität von etwa 1 kg/Tag gereinigten Produkts und in kommerziellem Massstab mit einer Ausbringkapazität von mindestens etwa 10 kg/Tag gereinigten Produkts durchgeführt wird.

Fig. 1 bis 4 zeigen ein Chromatogramm von Cyclosporin A und Verunreinigungen bei Schritten des Reinigungsverfahrens.

Fig. 5 ist eine schematische Darstellung der Phasenflüsse.

Cyclosporin A wird in einer Fermentationsbrühe hergestellt, die aufgearbeitet und filtriert wird. Fig. 1 zeigt ein Chromatogramm des gefilterten Produkts, das Cyclosporin A enthält; Cyclosporin A wird durch den Peak bei 24,418 repräsentiert.

#### Massstab einer Pilotanlage

Das filtrierte Produkt wird mit Aceton gemischt und Cyclosporin A wird durch das Aceton kristallisiert, wodurch ein Einsatzmaterial F1 gebildet wird. Das Einsatzmaterial F1 wird in eine Extraktionssäule (1, Pilotmassstab) auf halbem Weg aufwärts der Säule bei einer zentralen Zone f1 zugeführt. Säule 1 ist mit einem mechanischen Schüttler ausgestattet. Eine leichtere (organische) Phase LP, die aus 25 Gew.-% Aceton und 75 Gew.-% n-Heptan besteht, wird in die Säule 1 bei einer niedrigeren Zone b1 zugeführt. Eine schwerere (wässrige) Phase HP, die aus 50% Wasser und 50% Aceton besteht, wird in die Säule 1 bei einer oberen Zone a1 zugeführt. Die folgenden Fließgeschwindigkeiten wurden in der ersten Säule verwendet:

	Liter/Stunde
Einsatzmaterial (F1)	4,2
schwerere (wässrige) Phase (HP)	12,7
leichtere Phase (LP)	13

Ein Produktstrom S1, der Cyclosporin A mit polaren Verunreinigungen enthält, tritt aus der niedrigeren Zone in die wässrige Phase bei d1 aus; weniger polare Verunreinigungen werden in die leichtere Phase P1 entfernt, die aus der Säule 1 bei der oberen Zone c1 austritt. Fig. 2 zeigt ein Chromatogramm des Stroms S1 an dieser Stufe; Cyclosporin A wird durch den Peak bei 26,248 dargestellt.

Produktstrom S1 dient als Einsatzmaterial F2 für eine zweite Säule (2, Pilotmassstab) und wird in die Säule 2 auf halbem Weg aufwärts der Säule 2 bei der zentralen Zone f2 zugeführt. Die zweite Säule ist auch mit einem mechanischen Schüttler versehen. Die leichtere Phase LP wird in Säule 2 bei einer niedrigeren Zone b2 zugeführt, und die schwerere (wässrige) Phase HP wird in der Säule 2 bei der oberen Zone a2 zugeführt. Polarere Verunreinigungen werden in der schwereren Phase P2, die aus der Säule 2 bei der niedrigeren Zone d2 austritt, entfernt. Cyclosporin A wird im Produktstrom S2 mit der leichteren Phase von Säule 2 bei der oberen Zone c2 entfernt. Fig. 3 ist ein Chromato-

gramm des Stroms S2-Gemisches an dieser Stufe; Cyclosporin A wird durch den Peak bei 26,598 dargestellt.

Pfeilspitzen in Fig. 5 zeigen Richtungen von Phasen/Produkt/ Stromflüssen im Hinblick auf die Säulen an.

Die folgenden Fliessgeschwindigkeiten werden in der zweiten Säule verwendet:

	Liter/Stunde
Einsatzmaterial (F2)	3,1
schwerere (wässrige) Phase (HP)	9,7
leichtere Phase (LP)	17,7

Organische Lösungsmittel werden von dem Gemisch Cyclosporin A/ leichtere Phase destilliert, was nachfolgend mit Aceton gemischt wird, von dem Cyclosporin A kristallisiert wird. Cyclosporin A mit einer Reinheit von > 98,5% wird erhalten, wie sie durch Hochleistungsflüssigchromatografie bestimmt wurde. Fig. 4 zeigt ein Chromatogramm mit gereinigtem Cyclosporin A, das durch den Peak bei 26,368 dargestellt ist.

Der innere Durchmesser jeder in der Pilotanlage verwendeten Säule ist 6 cm.

#### Kommerzieller Massstab unter Verwendung einer 2-Säulen-Anordnung

A. Für den Betrieb im grossen kommerziellen Massstab unter Verwendung ähnlicher geometrischer Parameter und hydrodynamischer Bedingungen wie die, die in der Pilotanlage verwendet wurden, hat der Anmelder berechnet, dass 40 theoretische Stufen benötigt werden; die erste Säule hat einen Totalnutzeffekt von 25% und 160 Kompartimente. Die erste Säule hat eine Höhe von etwa 25 m und einen inneren Durchmesser von etwa 30 cm. Für die zweite Säule hat der Anmelder berechnet, dass 30 theoretische Stufen und 120 Kompartimente benötigt werden. Für die zweite Säule wurde berechnet, dass sie eine Höhe von etwa 25 m und einen inneren Durchmesser von etwa 80 cm aufweist.

Eine Reinigungsanlage unter Verwendung vorstehender Parameter wurde konstruiert.

Eine Menge von 50 kg Cyclosporin A wird hergestellt. Bei der Analyse des Cyclosporins unter Verwendung von HPLC betragen die Verunreinigungen weniger als 0,5 Flächen-%.

B. Unter Verwendung ähnlicher Geometrien und hydrodynamischer Bedingungen wie die, die in der Pilotextraktionssäule verwendet wurden, berechnet der Anmelder, dass 44 theoretische Stufen bei einer Effizienz von etwa 27% im ersten CCE-Schritt benötigt werden. Für die erste Säule wird berechnet, dass sie eine Höhe von etwa 27 m, einen inneren Durchmesser von etwa 45 cm und 160 Kompartimente hat. Für die zweite Säule berechnet der Anmelder, dass 62 theoretische Stufen bei einer Effizienz von etwa 38% benötigt werden. Für die zweite Säule wird berechnet, dass sie eine Höhe

von etwa 34 m und einen inneren Durchmesser von etwa 70 cm und 160 Kompartimente haben muss.

Eine Reinigungsanlage wird unter Verwendung dieser Parameter konstruiert.

5 Eine Menge von 100 kg Cyclosporin A wird hergestellt. Bei der Analyse des Cyclosporins unter Verwendung von HPLC betragen die Verunreinigungen weniger als 0,5 Flächen-%.

Die vorliegende Erfindung schafft ein kontinuierliches Verfahren zum Reinigen eines Produkts bzw. von Produkten in grossem Massstab von Verunreinigungen, wobei das Produkt bzw. die Produkte und Verunreinigungen ähnliche physikalische Eigenschaften miteinander haben. Grössere Reinheiten bei einer bestimmten Ausbeute oder grössere Ausbeute bei einer bestimmten Reinheit können unter Verwendung dieses Verfahrens erreicht werden als durch Verwendung chromatografischer Reinigung. Das Verfahren ist bei Betrieb ökonomischer, da die Produktströme nicht geteilt und/oder zurückgeführt werden müssen, wie es im Allgemeinen bei der Absorptionschromatografie erforderlich ist.

20 Das Gegenstromverfahren der Erfindung ist überraschenderweise effizienter als die Reinigung durch Chromatografie, und mehrfache Rückfuhrschritte werden vermieden. Das erfindungsgemäss Verfahren erlaubt einfacher die Simulation und die Einstellung von Prozessparametern, um eine erwünschte Reinheit zu erzielen, als bei der Verwendung der Chromatografie. Verbindungen von nah verwandter Struktur werden überraschenderweise leichter von einander in kommerziellem Massstab getrennt, zum Beispiel Cyclosporin A von Cyclosporinen B und C.

#### 35 Patentansprüche

1. Verfahren zum Reinigen eines Produkts im grossen Massstab aus einem Einsatzmaterial, das eine oder mehrere Verunreinigungen enthält, die nah verwandte physikalische Eigenschaften mit dem Produkt aufweisen, wobei das Verfahren umfasst:

40 Zuführen des Einsatzmaterials in eine Extraktions säule unter Bedingungen, die für das Trennen von mehr oder weniger polaren Verunreinigungen von dem Einsatzmaterial angepasst sind, wobei eine leichtere Phase gegen eine schwerere Phase fliessst, wodurch eine Ausbringung in einer Phase gebildet wird, die das mehr oder weniger polare Verunreinigungen enthaltende Produkt aufweist, so dass die Ausbringung das Produkt in einer im Wesentlichen gereinigten Form aufweist und wobei die leichtere Phase Heptan und Aceton oder Heptan und Isopropanol, die schwerere Phase Wasser und Aceton oder Wasser und Isopropanol aufweist, und das Produkt ein Cyclosporin, ein Rapamycin oder ein Ascomycin ist.

45 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die leichtere Phase etwa 25 Gew.-% n-Heptan und etwa 75 Gew.-% Aceton oder etwa 90 Gew.-% n-Heptan und etwa 10 Gew.-% Isopropanol aufweist.

50 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die schwerere Phase etwa 50 Gew.-% Wasser und etwa 50 Gew.-% Aceton oder etwa 68 Gew.-% Wasser und etwa 32 Gew.-% Isopropanol aufweist.

4. Verfahren zum Reinigen eines Produkts in grossem Massstab von einem Einsatzmaterial, das eine oder mehrere Verunreinigungen enthält, die nah verwandte physikalische Eigenschaften mit dem Produkt aufweisen, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

a) Zuführen des Einsatzmaterials in eine erste Extraktionssäule unter Bedingungen, die zum Trennen von mehr oder weniger polaren Verunreinigungen von dem Einsatzmaterial angepasst sind, wobei eine leichtere Phase gegen eine schwerere Phase fliest, wodurch eine erste Ausbringung in einer Phase gebildet wird, die das Produkt aufweist, das weniger mehr oder weniger polare Verunreinigungen enthält, und

b) Zuführen der ersten Ausbringung in eine zweite Extraktionssäule unter Bedingungen, die für das Trennen von weniger bzw. mehr polaren Verunreinigungen von der ersten Ausbringung angepasst sind, wobei die leichtere Phase gegen die schwere Phase fliest, wodurch in einer Phase eine zweite Ausbringung gebildet wird, sodass die zweite Ausbringung das Produkt in einer im Wesentlichen gereinigten Form enthält, wobei die leichtere Phase Heptan und Aceton oder Heptan und Isopropanol, die schwerere Phase Wasser und Aceton oder Wasser und Isopropanol aufweist und das Produkt ein Cyclosporin, ein Rapamycin oder ein Ascomycin ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die leichte Phase etwa 25 Gew.-% n-Heptan und etwa 75 Gew.-% Aceton oder etwa 90 Gew.-% n-Heptan und etwa 10 Gew.-% Isopropanol aufweist.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die schwerere Phase etwa 50 Gew.-% Wasser und etwa 50 Gew.-% Aceton oder etwa 68 Gew.-% Wasser und etwa 32 Gew.-% Isopropanol aufweist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Produkt Cyclosporin A, Cyclosporin D oder ein Derivat davon, Cyclosporin G oder ein Derivat davon, Rapamycin, 40-O-(2-Hydroxy)ethyl-Rapamycin, Ascomycin, 33-Epi-chloro-33-desoxyascomycin oder FK 506 ist.

8. Gegenstromextraktionssäule zur Anwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 mit zwischen 100 bis 200 Kompartimenten und einem Totalnutzeffekt von 10 bis 30%.

9. Eine Menge von Cyclosporin A mit einem Verunreinigungsgehalt von weniger als 0,5% der Fläche unter Verwendung von HPLC, erhalten durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

10. Eine Zusammensetzung, die als aktives Mittel Cyclosporin A, wie es in Anspruch 9 beansprucht ist, umfasst.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

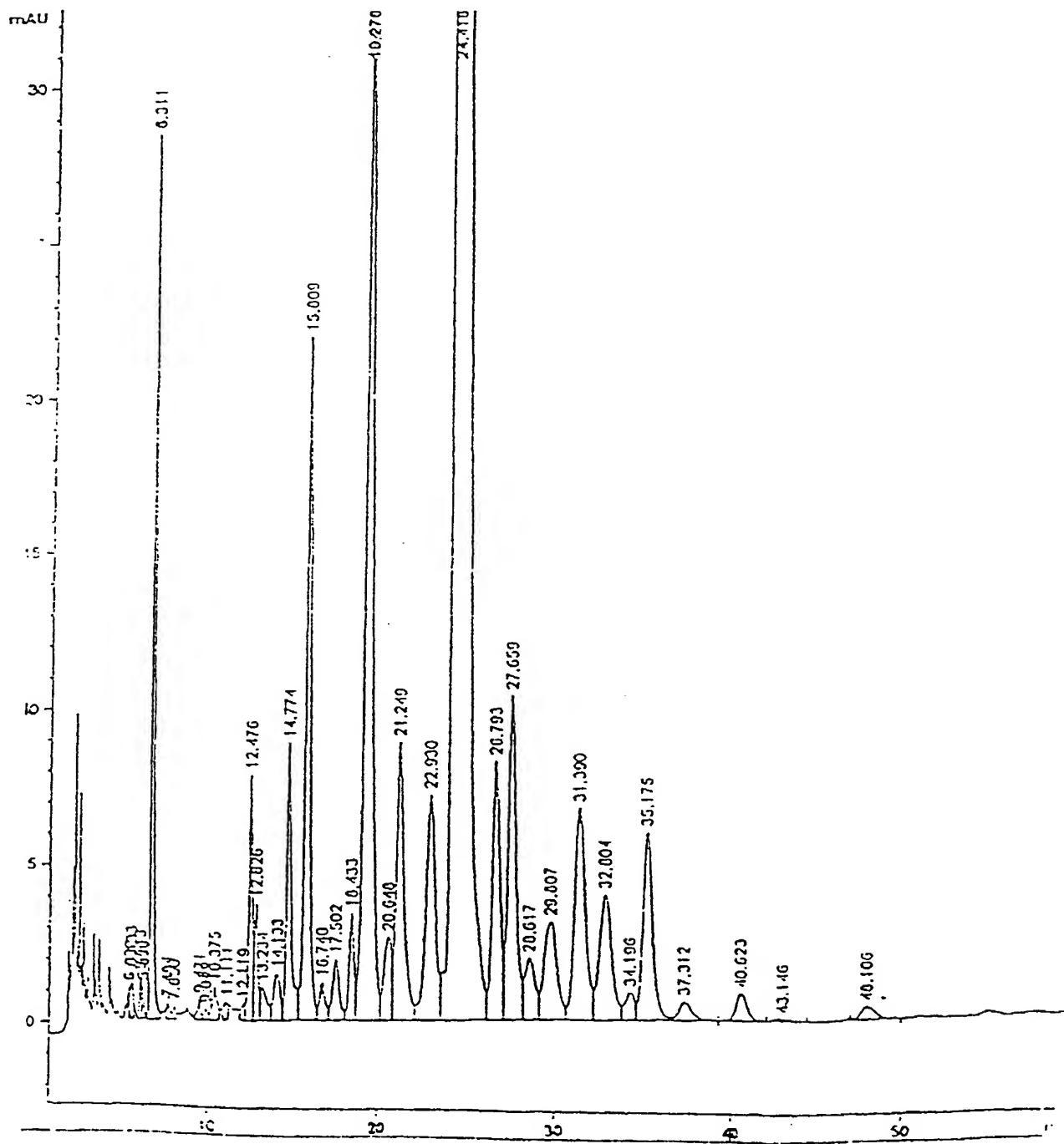


Fig. 2

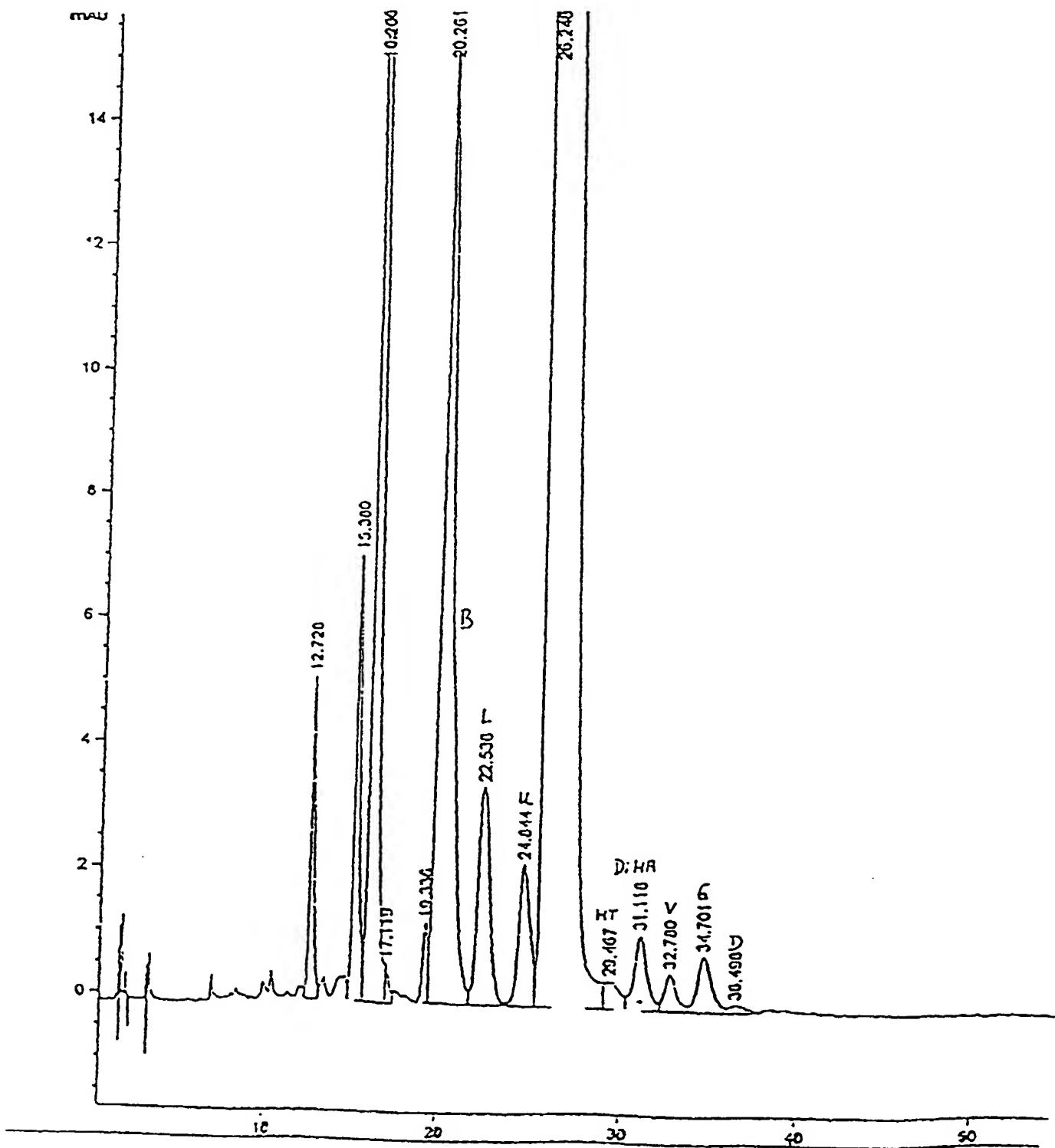


fig. 3

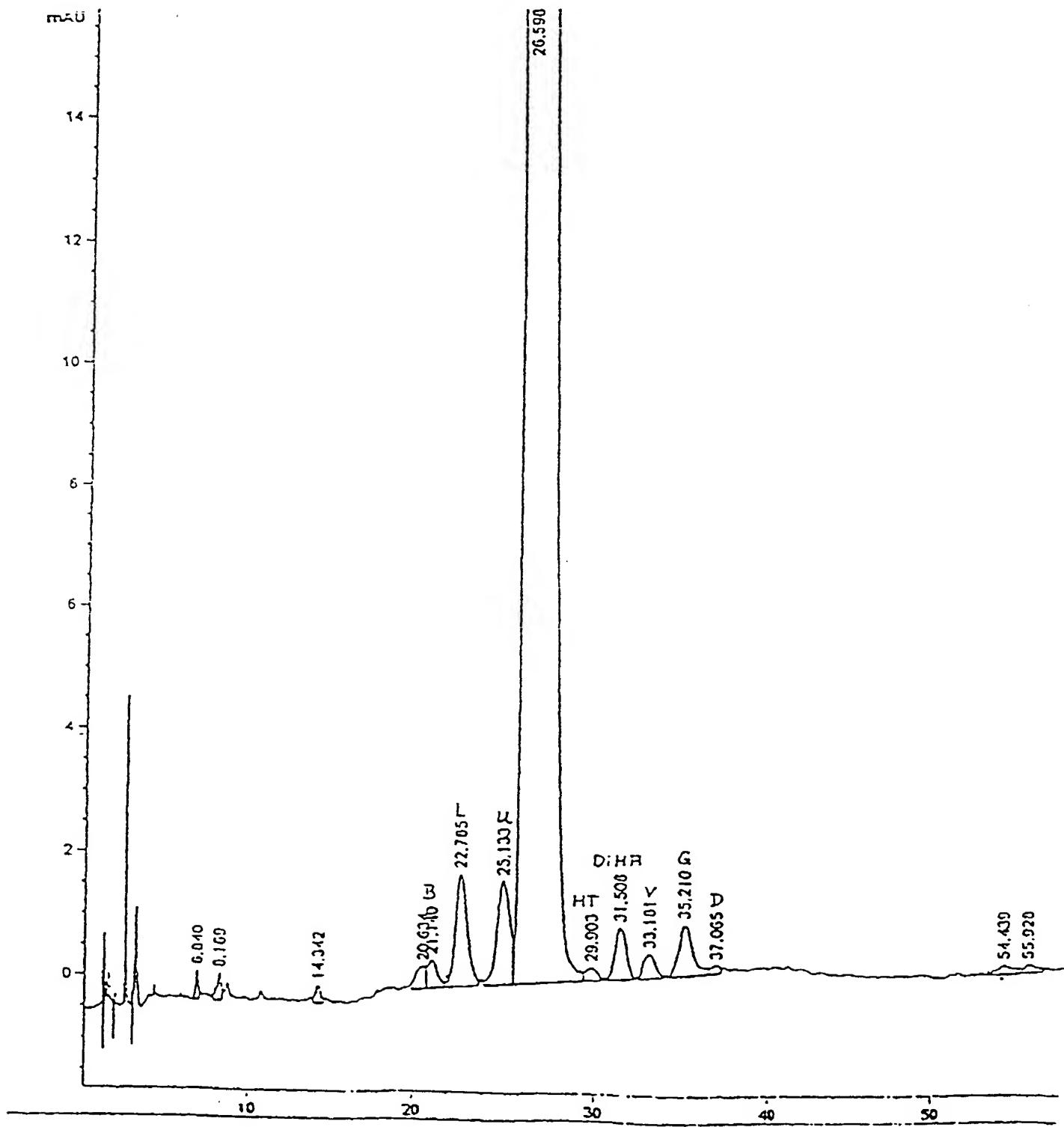


Fig. 4

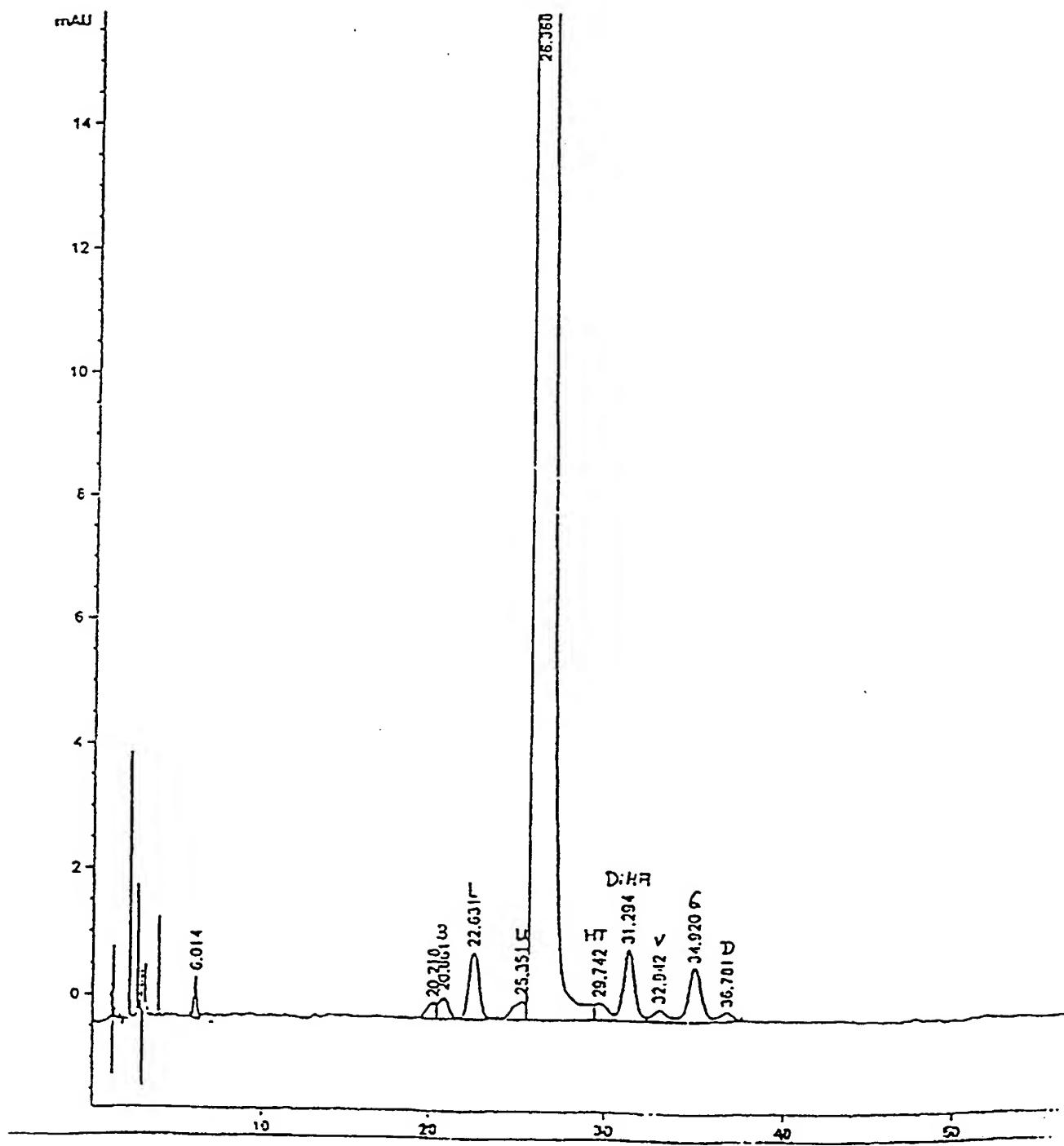
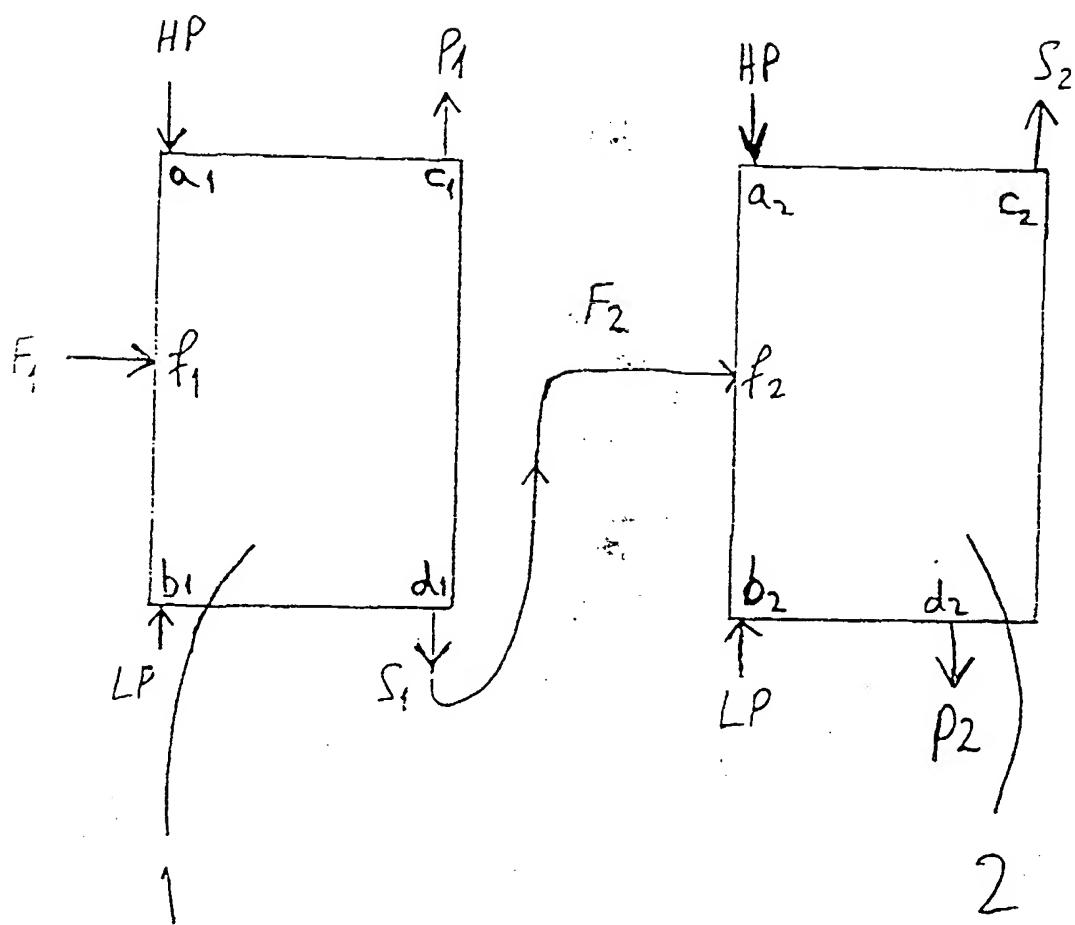


Fig. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**